



TESAJ HA TEKOK
PORAVE
MOTENONDERA
MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA
Y BIENESTAR SOCIAL



MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL



DE LEPRA



**PROGRAMA NACIONAL
DE CONTROL DE LA LEPRA**

EDICIÓN I • AÑO 2017

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

DR. ANTONIO BARRIOS

Ministro de Salud Pública y Bienestar Social

DRA. MARIA TERESA BARÁN

Viceministra de Salud

DRA. ÁGUEDA CABELLO

Directora General de Vigilancia de la Salud

DRA. ESTELA QUIÑONEZ DE MEZA

Directora de Enfermedades Transmisibles

DRA. VICTORIA ALVARENGA DE MORRA

Directora del Programa Nacional de Control de la Lepra

El Manual de Diagnóstico Laboratorial de Lepra, del Programa Nacional de Control de la Lepra, fue realizado conforme a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.

Participaron en su realización, el equipo de trabajo del Programa Nacional de Control de la Lepra, del Centro de Especialidades Dermatológicas y, contó con la Cooperación técnica de la OPS/OMS.

El objetivo de este Manual es que el mismo sirva como un instrumento de orientación, que ayude a todo el personal de laboratorio.

COMISIÓN DE REDACCIÓN

DRA. VICTORIA ALVARENGA DE MORRA

Directora del Programa Nacional de Control de la Lepra – MSPBS

DRA. MERCEDEZ ALVAREZ DE OVELAR

Jefa del Laboratorio de Microbiología del Programa Nacional de Control de la Lepra

BIOQ. JOSÉ PEREIRA BRUNELLI

Bioquímico del Laboratorio de Microbiología del Programa Nacional de Control de la Lepra

El Manual de Diagnóstico laboratorial del Programa Nacional de Control de la Lepra, ha contado con la cooperación técnica de la OPS/OMS.

Imágenes y fotografías: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social

Diseño editorial: DR Creativo

Paraguay 2017

INDICE

PRESENTACIÓN	7
INTRODUCCIÓN	9
1. CONSIDERACIONES GENERALES DE LA LEPRO	
1.1. Agente Etiológico	10
1.2. Clasificación Clínica	10
1.3. Clasificación Operacional	12
1.4. Signos y Síntomas de la Lepra	12
2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	
2.1. Baciloscopía	13
2.1.1. Procedimiento	13
2.1.2. Materiales necesarios	13
2.1.3. Toma de muestra	14
2.1.4. Fijación	14
2.1.5. Acondicionamiento y transporte	15
2.1.6. Coloración del frotis por el método de Ziehl-Neelsen en frío	15
2.1.7. Observación microscópica	15
2.1.7.1. Índice Bacteriológico (IB)	16
2.1.7.2. Índice Morfológico (IM)	16
2.1.7.3. Bacilos Solidos	16
2.1.7.4. Bacilos Fragmentados	17
2.1.7.5. Bacilos Granulados	18

2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
2.2.1. Fundamento	19
2.2.1.1. PCR en tiempo real	19
2.2.2. Procedimiento	20
2.2.3. Materiales necesarios	20
2.2.4. Toma y envío de muestras	20
2.2.5. Interpretación de resultados	21
2.3. Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en lepra	21
2.3.1. Objetivos	22
2.3.2. Métodos de detección de resistencia a drogas	22
2.3.3. Definiciones y procedimientos	23
2.2.3.1. Pacientes incluidos en el estudio	23
2.2.3.2. Materiales necesarios	23
2.2.3.3. Toma y envío de muestras	23
2.2.3.4. Reporte de resultados	23
2.4. Otros métodos diagnósticos	24
2.4.1. Pruebas serológicas	24
ANEXOS	25
Ficha de envío de material de Baciloscopía	25
Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antimicrobiana (página 1)	26
Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antimicrobiana (página 2)	27
Reporte de resultado de Baciloscopía	28
Preparación de reactivos para Baciloscopía	29
BIBLIOGRAFÍA	30

PRESENTACIÓN

Las enfermedades causadas por las micobacterias, en la actualidad aquejan a millones de personas en el mundo, siendo la Lepra o Mal de Hansen, una de las enfermedades más antiguas, y en nuestro país de interés en Salud Pública.

Desde el punto de vista epidemiológico llama la atención que el descenso mundial de la prevalencia de la Lepra no se ha acompañado de un descenso de su incidencia, o sea que no se haya podido prevenir la transmisión de la enfermedad, pese a que se ha adoptado la poliquimioterapia en los Programas, con un seguimiento muy estricto.

Una parte importante de la vigilancia y diagnóstico de los casos de lepra lo constituye el Laboratorio que sirve como apoyo para la confirmación y clasificación de los casos, al monitoreo del tratamiento, la vigilancia a la resistencia antimicrobiana, y al control de los contactos, entre otros.

INTRODUCCIÓN

La lepra, o enfermedad de Hansen, es una enfermedad bacteriana antigua que, aunque es curable, sigue siendo un problema de salud en muchas partes del mundo. La lepra es causada por el bacilo *Mycobacterium leprae*, que produce una infección crónica en humanos que afecta principalmente a los nervios periféricos y la piel, requiriendo de la participación de factores inmunogénicos para el desarrollo de la enfermedad, pero también puede afectar a otros sitios; como los ojos, las membranas mucosas, los huesos y los testículos y produce un espectro de fenotipos clínicos.

La lepra es de notificación obligatoria mensual, curable, sin secuelas en sus estadíos iniciales, pero invalidante y discapacitante en sus estadíos avanzados o dejados a la evolución natural. El *Mycobacterium leprae* es de baja virulencia. Para contagiarse de la lepra se precisa:

- a) Convivir con el paciente por años.
- b) Estar genéticamente predispuesto para adquirir la enfermedad.

Dado que los aspectos bioepidemiológicos dan como resultado varias manifestaciones clínicas y complicaciones, se requiere un buen método diagnóstico para confirmar la enfermedad y su correcta clasificación para asegurar el tratamiento adecuado. Sin embargo, es extremadamente difícil detectar *Mycobacterium Leprae* en un individuo a inicios de la enfermedad y se utilizan varios criterios clínicos y laboratoriales en ausencia de un examen definido como "patrón oro". La baciloscopia, el examen histopatológico, la serología y la reacción en cadena de la polimerasa se utilizan con mayor frecuencia para el diagnóstico de la lepra.

En Paraguay, el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, a través del Programa Nacional de Control de la lepra, la Asociación Alemana de Ayuda al Enfermo de Lepra (DAHW), y el Hospital Menonita de Km 81 -Cordillera, han contribuido para reducir la Tasa de Prevalencia a menos de 1 caso por 10.000 habitantes.

Este logro, sin embargo, no debe conducirnos a bajar la dinámica de las actividades de control, ya que el número de casos nuevos por año se mantiene estable y en varias regiones sanitarias la cobertura de algunos distritos se completó recién en el año 2005.

Los diferentes exámenes laboratoriales son de suma importancia no sólo para un diagnóstico certero y temprano de la enfermedad, sino también aportan para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades dermatoneurológicas, casos sospechosos de recidiva, resistencia y en la clasificación para el tratamiento.

En el Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas del PNCL, gracias a convenios de cooperación con Centros de Investigación, se cuenta con diagnóstico por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); un método con elevada sensibilidad y especificidad, además de la Baciloscopia, método comúnmente utilizado por su fácil ejecución, poco invasivo y de bajo coste para su implementación a nivel nacional.

1 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA LEPRA

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

El *Mycobacterium leprae* o bacilo de Hansen tiene un diámetro de 0.3 a 0.5 micras y una longitud de 4 a 7 micras. Es curvado generalmente en uno de los extremos y es más corto que el de la tuberculosis.

Es un Bacilo Acido Alcohol Resistente (BAAR) intracelular, pleomorfo y usualmente con forma de bastón.

Clasificación científica:

Reino	:	Bacteria.
Filo	:	Actino bacteria.
Orden	:	Actinomycetales.
Familia	:	Mycobacteriaceae
Género	:	Mycobacterium.
Especie	:	<i>M. leprae</i> .
Nombre binomial	:	<i>Mycobacterium leprae</i> .

El bacilo tiene un tiempo de duplicación de 12 a 14 días en la almohadilla plantar del ratón.

La temperatura óptima para su crecimiento es de 30°C de ahí su preferencia por las zonas frías de la piel y nervios periféricos. Expuesto al ambiente puede permanecer viable por 7 días aproximadamente.

Es inmóvil y se divide por bipartición. Secreta glea, sustancia pegajosa y responsable de la agregación de bacilos llamados globías, para resistir a los embates del sistema inmunológico del organismo.

1.2. CLASIFICACIÓN CLINICA

Se han propuesto varias clasificaciones para la lepra a lo largo de los años a medida que se obtienen nuevos conocimientos sobre la enfermedad. La clasificación de Madrid, establecida en el Congreso Internacional de Lepra, celebrado en Madrid en 1953, sigue el sistema polar definido en 1936 por Rabello Jr. Este sistema se basa en las características clínicas y el resultado de frotis de piel, dividiendo la lepra en dos grupos inmunológicamente inestables (Lepra Indeterminada y Lepra Bordeline) y dos tipos polares estables (Lepra tuberculoide y Lepra lepromatosa).

Lepra indeterminada (HI): que se caracteriza por manchas (máculas) levemente blanquecinas, una o múltiples, en cualquier área de la piel, con pérdida o disminución de la sensibilidad en las mismas. La Lepra o Hansen Indeterminada, es considerada como la forma de comienzo de la lepra.



Lepra Borderline o dimorfa (HB): es la forma de lepra donde se ven entremezcladas lesiones que se parecen a lepra tuberculoide (lesiones de bordes netos) con lesiones de tipo lepromatoso (manchas eritematosas sin bordes definidos). Característicamente son lesiones anulares y según predomine uno de los dos polos serán escasas o numerosas y de bordes bien delimitados o evanescentes.



Lepra tuberculoide (HT): esta es la forma no bacilífera. Se pueden ver una o más manchas de bordes bien definidos, circulares, que recuerdan al "uñé" (tiña del cuerpo). Representa una exagerada respuesta inmune ante la presencia de bacilos que son destruidos rápidamente, de modo que son lesiones abacilíferas.



Lepra Lepromatosa (HL): Esta forma es la que más bacilos tiene y la abundancia de bacilos se debe a la resistencia disminuida del paciente. Se observan manchas eritematosas o parduzcas, generalmente múltiples, sin bordes definidos, en toda la piel. También pueden presentar nódulos (lepromas).



1.3. CLASIFICACIÓN OPERACIONAL

En 1988, la OMS recomendó el uso de un método de clasificación puramente clínica, estableciendo como Lepra Paucibacilar (PB), aquellos pacientes con hasta cinco lesiones cutáneas y / o sólo un tronco nervioso implicado, mientras que los casos de Lepra Multibacilar (MB), son aquellos con más de cinco lesiones y / o más de un tronco nervioso involucrado. Sin embargo, cuando el examen microscópico de la piel está disponible, los pacientes con resultados positivos, son considerados MB, independientemente del número de lesiones.

MB	PB
> de 5 manchas	5 manchas o menos
2 o más nervios afectados	1 solo nervio afectado
IB (+)	IB (-)

Las formas **I** y **T**, se denominan **PB** (Paucibacilar).

Las formas **L** y **B**, se denominan **MB** (Multibacilar).

Para el tratamiento con PQT esta clasificación será útil para el tipo y tiempo de su administración.

1.4. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA LEPROA

Un enfermo de lepra es alguien que tiene una o más manchas cutáneas con trastornos de sensibilidad.

Manchas de Lepra

- Pueden ser blanquecinas, rojizas o amarronadas;
- Pueden ser aplanadas o elevadas;
- No pican; no duelen, no sudan;
- Pierden la sensación de calor, tacto o dolor;
- Pueden aparecer en cualquier parte de la piel;
- Pueden ser únicas o múltiples.

Otros signos de la enfermedad

- Nódulos (lepromas) rojizos o del color de la piel;
- Engrosamiento de nervios periféricos;
- Alopecia de cola de cejas;
- Pérdida de pestañas (madarosis);
- Infiltración de lóbulos auriculares.

2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1. BACILOSCOPIA

La Baciloscopia se realiza para detectar Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR) en frotis de piel recogidos desde sitios como lesiones de la piel, lóbulo de las orejas, codos y rodillas. Se realiza utilizando la tinción de Ziehl – Neelsen en frío. Técnica que permite evaluar el índice morfológico (IM) y el índice bacteriológico (IB).

2.1.1 Procedimiento

Como en otros procedimientos de laboratorio, en el momento de la recolección es necesario que los materiales indicados a continuación, estén disponibles y que todos los profesionales estén debidamente protegidos, utilizando equipos de protección personal (EPP) como: guantes, máscaras y guardapolvos.

2.1.2. Materiales necesarios

- Alcohol al 70° y 96°.
- Colorante de Fucsina.
- Colorante azul de metileno 0,3%.
- Acido – Alcohol 1%.
- Agua de canilla.
- Laminas esmeriladas.
- Mechero.
- Gradilla de láminas.
- Gasas estériles.
- Algodón estéril.
- Bisturí nro. 15.
- Papel toalla.
- Guantes.
- Lápiz de papel.

2.1.3. Toma de muestra

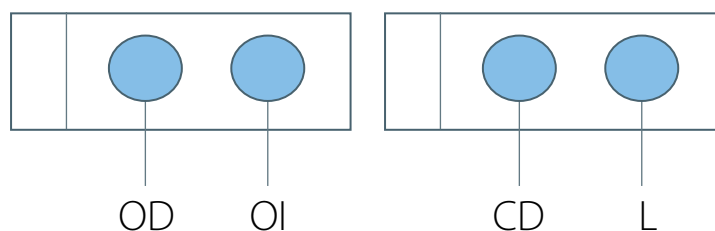
Después de desinfectar con alcohol 70°, con los dedos índice y pulgar de una mano se comprime firmemente la piel para descongestionarla de sangre lo máximo posible (isquemia provocada) y luego con un instrumento cortante (hoja de bisturí desechable N° 15) se practica un corte pequeño de unos 5 mm de largo con profundidad suficiente (2 mm a 3 mm) para alcanzar el tejido subcutáneo.

Sin aflojar los dedos, para evitar que fluya sangre, se raspa girando el bisturí un ángulo de 90° varias veces, y la sustancia semi-líquida recogida se esparce sobre la lámina procurando formar una capa delgada y uniforme (frotis de linfa cutánea). Recordar la importancia del raspado suave de tejido para conseguir células, que es donde se encontrarán los bacilos.



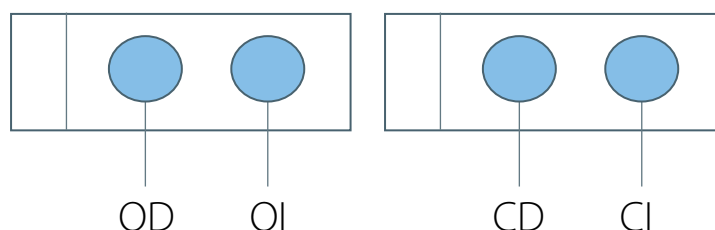
En pacientes con lesiones cutáneas visibles o áreas con alteración de sensibilidad, la recolección deberá realizarse en el lóbulo de la oreja derecha (OD), el lóbulo de la oreja izquierda (OI), codo derecho (CD) y lesión (L) (figura 8). En las lesiones planas, recoger en el límite interno. En los nódulos y tubérculos recoger en el centro.

Fig. 8 Disposición de los frotis en láminas de pacientes con lesiones



En pacientes que no presentan lesiones activas visibles, recoger material del lóbulo de la oreja derecha (OD), el lóbulo de la oreja izquierda (OI), codo derecho (CD) y el codo izquierdo (CI), según figura 2.

Fig. 9 Disposición de los frotis en láminas de pacientes sin lesiones



2.1.4. Fijación

La muestra de linfa cutánea se deja secar al aire por un minuto y luego, poniendo el dorso de la lámina de vidrio un breve instante sobre la llama (3 segundos), se "fija" por el calor evitando quemarla.

2.1.5. Acondicionamiento y transporte

La muestra queda útil por varias semanas. Cada lámina lleva la identificación que corresponde como fecha, nombre y zona de toma de muestra (ej: oreja derecha, codo derecho, etc). Las muestras, que deben ser enviadas a un laboratorio, deben ser previamente envueltas en papel (pañuelo desechable).

2.1.6. Coloración del frotis por el método de Ziehl-Neelsen en frío

El método de tinción en frío es el recomendado por preservar la morfología del bacilo. Además, evita que los vapores tóxicos de fenol, presentes en la fucsina, sean inhalados por el profesional.

La coloración de las láminas se realiza en los siguientes pasos:

- Colocar las láminas en soporte apropiado, separadamente una de la otra.
- Cubrir todo el frotis con la solución de fucsina de Ziehl-Neelsen, previamente filtrada, durante 20 minutos.
- Retirar la lámina del soporte y lavar en agua corriente bajo baja presión.
- Decolorar los frotis con solución de alcohol ácido al 1%, hasta que los mismos tomen una coloración rosada pálida (aprox. 3 segundos).
- Lavar nuevamente la lámina en agua corriente bajo baja presión.
- Cubrir todo el frotis con solución de azul de metileno al 0,3% por 3 minutos.
- Lavarla en agua corriente bajo baja presión y dejar secar a temperatura ambiente.

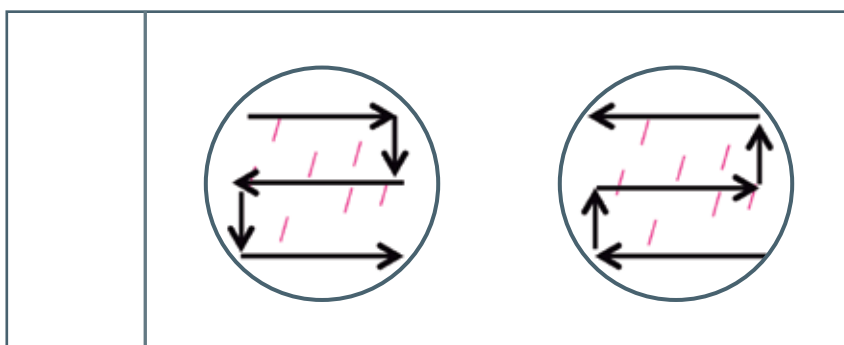
2.1.7. Observación microscópica

Para la lectura de los frotis, seguir los siguientes pasos:

- Utilizar el microscopio con objetivo de inmersión (aumento de 100x) y objetivo de 10x.
- Examinar inicialmente con objetivos de pequeño aumento (10x) para seleccionar campos que contengan muchos macrófagos y evitar aquellos con hematíes.
- Agregar una gota de aceite de inmersión y luego pasar a objetivo de inmersión (100x), ajustando el foco con la ayuda del micrométrico.
- Comenzar a examinar el frotis en la parte superior según figura 10 o inferior según figura 11, sistemáticamente, en zig-zag en 100 campos representativos, conforme el esquema a seguir:

Fig. 10

Fig. 11



- Los Bacilos Acido Alcohol Resistentes se observan de color rosado.

2.1.7.1. Índice Bacteriológico (IB)

El Índice Bacteriológico (IB), propuesto por Ridley en 1962, se basa en una escala logarítmica con variación entre 0 a 6+. Es el método de evaluación cuantitativa más correcto y utilizado en la lectura de la baciloscopia en lepra.

Escala Logarítmica de Ridley

(0)	Ausencia de bacilos en 100 campos examinados.
(1+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en 100 campos examinados.
(2+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en cada 10 campos examinados.
(3+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(4+)	Presencia de 10 a 100 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(5+)	Presencia de 100 a 1.000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(6+)	Presencia de más de 1.000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.

Observación: Para los índices de 0 a 3+ se deben examinar 100 campos microscópicos; de 4+ a 6+, la lectura podrá realizarse en 25 campos.

El IB del paciente es calculado por la media aritmética de los IBs de cada sitio de acuerdo con el siguiente ejemplo:

OD= 2+	
OI= 3+	IB= $\frac{2+3+2+4}{4} = 2,75$
CD= 2+	
Lesión= 4+	

2.1.7.2. Índice Morfológico (IM)

Este es el índice utilizado para describir el aspecto de la morfología del *M. leprae* en los frotis. Cuando se someten a la coloración, los bacilos se colorean, en su gran mayoría, irregularmente. Pueden observarse aisladamente o formarse aglomerados o globías que son estructuras formadas a partir de una sustancia incolora (glea) que se dispone entre los bacilos uniéndolos de forma arreglada y organizada.

Considerando que la lectura del IM requiere habilidad y mucha práctica, además de ser un análisis de carácter subjetivo, se recomienda que, cuando sea necesario, sea realizada solamente en los centros de referencia con más experiencia. La descripción morfológica de los bacilos es de especial importancia en los casos de sospechas de recidiva y resistencia medicamentosa.

Desde el punto de vista morfológico, el *M. leprae* puede presentarse en las formas de bacilo íntegro, fragmentado o granuloso, siendo el íntegro considerado la forma viable, conforme figuras 12 y 14.

2.1.7.3. Bacilos Solidos

Se consideran viables o vivos por presentarse totalmente coloreados en rosado y sin defectos de coloración en su pared celular. Se ven en frotis de pacientes que aún no han recibido el tratamiento o en los casos de recidiva de la enfermedad.

2.1.7.4. Bacilos Fragmentados

Son bacilos que presentan pequeñas fallas en su pared celular debido a la interrupción de la síntesis de los componentes de la misma. Se consideran inviables o muertos y se observan frecuentemente en pacientes que ya terminaron su tratamiento.

Fig 12. Diferentes formas de *M. leprae*. D. Leiker e A.C. McDougall –
Guía Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987

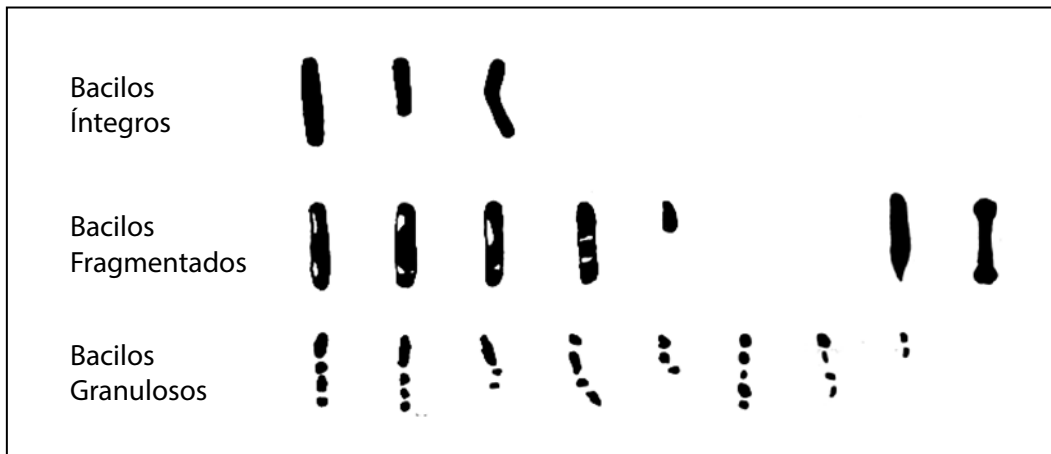


Fig 13. Ejemplo de Resultado de Baciloscopia en Paciente con Lepra

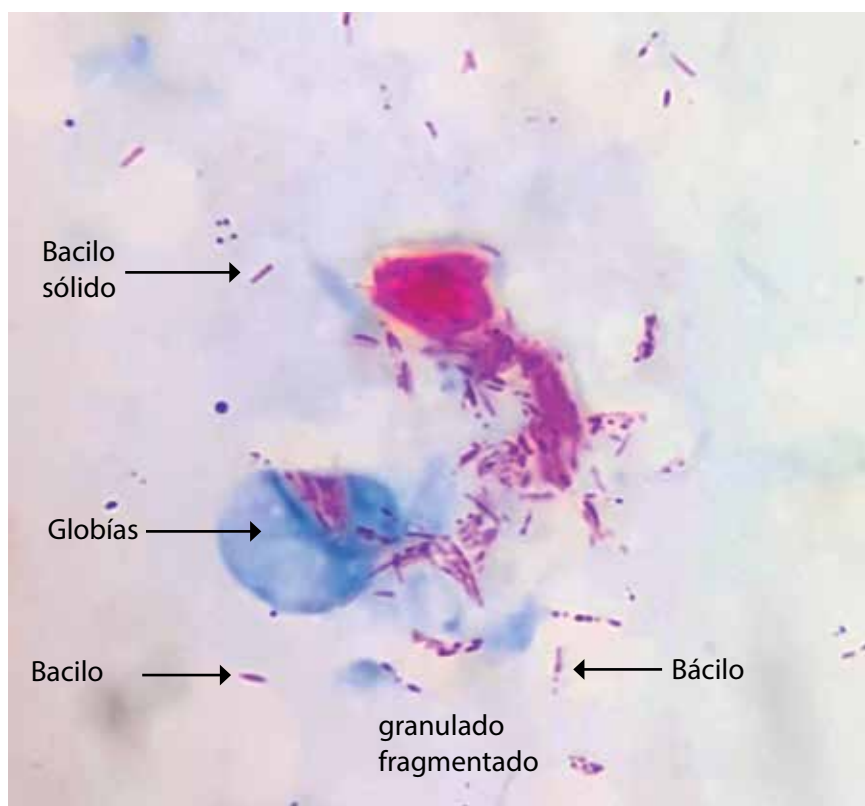
BACILOSCOPIA

MATERIAL	Raspado intradérmico
Coloración de Ziehl-Neelsen:	Se observa Bacilos Acido Alcohol Resistente

RESULTADO

	INDICE BACILAR (IB)	INDICE MORFOLOGICO (IM)
Oreja Derecha	3+	3%
Codo Derecho	4+	3%
Oreja izquierda	3+	3%
Codo Izquierdo	4+	3%
Lesión		
IB DEL PACIENTE: 3		

Fig 14. Coloración de Ziehl – Neelsen. Morfología de los Bacilos sólidos, fragmentados, granulados y globías



2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

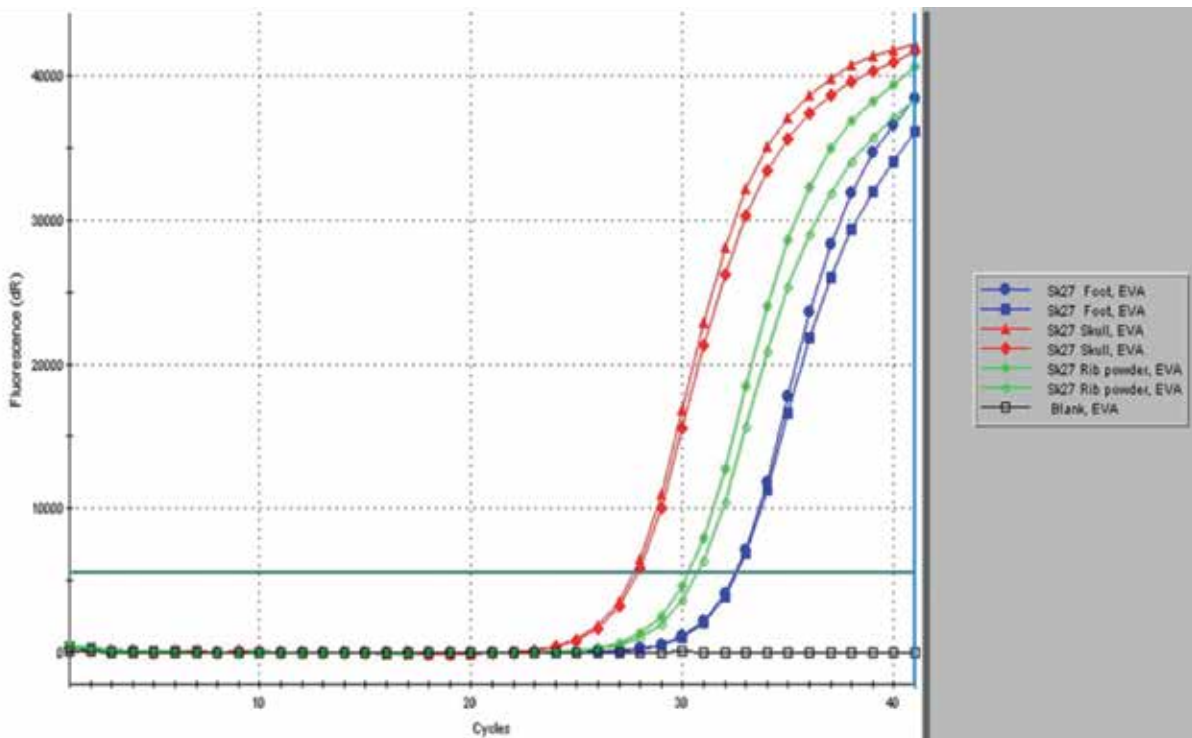
La PCR permite detectar microorganismos de crecimiento lento o incultivable y, a partir de los datos genéticos disponibles, se ha utilizado para detectar *M. leprae*, desde 1989.

Debido a la dificultad de encontrar bacilos resistentes al alcohol-ácido (BAAR), a través de los métodos histopatológicos en las primeras etapas de la enfermedad o en las formas neurales puras, la técnica de PCR se ha utilizado con éxito para detectar pequeñas cantidades de bacilos en los tejidos; además es útil para demostrar la infección subclínica en los contactos; seguimiento del tratamiento; determinar la curación de los pacientes o su resistencia a los medicamentos (Terapia multidroga) MDT; distinguir la reacción de la recurrencia; Y ayudar a entender los mecanismos de transmisión de *M. leprae*.

Se basa en la amplificación de secuencias específicas del genoma de *M. leprae* y en la identificación del fragmento de ácido desoxirribonucleico amplificado (ADN) o ácido ribonucleico (ARN).

Además de las técnicas convencionales de PCR, se han utilizado otras técnicas para detectar *M. leprae*, incluyendo PCR anidada (Nested PCR), amplificación genómica total y PCR en tiempo real. La PCR de transcriptasa reversa de ARN ribosómico de *M. leprae* puede determinar la viabilidad del bacilo. Esta técnica se limita a los centros de investigación, debido al alto costo de los reactivos ya la necesidad de equipos específicos y profesionales calificados. El Programa Nacional de Control de la Lepra, a partir de la firma de convenios con centros de investigación, realiza la detección de *M. leprae* por PCR en tiempo real.

Fig. 15. PCR en tiempo real



Ejemplo de perfiles de amplificación RLEP que muestran datos obtenidos de extractos de hueso del pie (trazo azul), una costilla (trazo verde) y un fragmento de hueso del cráneo (trazo rojo) Investigación de un entierro medieval excavado en el Leprosario de St. Mary Magdalen Winchester, Reino Unido.

2.2.1. Fundamento

2.2.1.1. PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aún teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia

La técnica empleada para la detección del DNA de *M. Leprae* es la amplificación de la secuencia repetitiva RLEP utilizando la tecnología TaqMan. Los primers y sonda utilizados fueron descritos por Richard W. et al. Los primers, que amplifican la región repetida en tándem (RLEP) de *M. Leprae*, son: 5'-GCAGTATCGTGTAGTGAACAGTGCA-3' (forward) y 5'-GCACATACGGCAACCTTCTAGCG-3' (reverse); y la sonda utilizada es: 5'-/56-FAM/TCGATGATCCGGCCGTCGGCG/ 3BHQ_1/-3'. La amplificación se realiza utilizando Maxima Probe qPCR Master Mix (2X) (#K0261 Thermo Scientific®).

Las reacciones son llevadas a cabo utilizando el termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen) en un volumen final de 20uL. Para cada reacción de amplificación son añadidos controles positivos y negativos.

2.2.2. Procedimiento

Como en otros procedimientos de laboratorio, en el momento de la recolección es necesario que los materiales indicados a continuación, estén disponibles y que todos los profesionales estén debidamente protegidos, utilizando equipos de protección personal (EPP) como: guantes, máscaras y guardapolvos.

2.2.3. Materiales necesarios

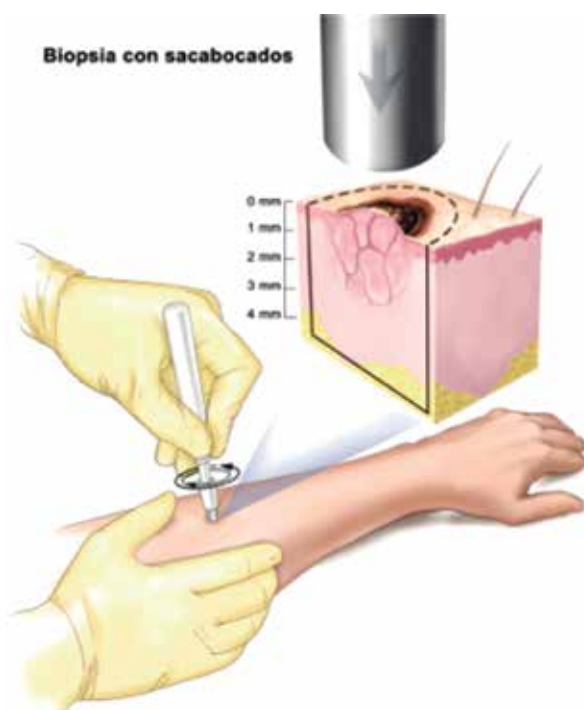
- Alcohol al 70°
- Gasas estériles
- Algodón estéril
- Guantes
- Lidocaína al 2% inyectable
- Jeringas de insulina de 1 mL
- Punch o sacabocados nro. 4
- Tubos eppendorf 1,5 mL

2.2.4. Toma y envío de muestras

La muestra utilizada para la detección de *M. leprae* por PCR es la biopsia de piel. La misma debe ser tomada de las lesiones. En el caso de sospecha de lepra neural o difusa, la muestra debe ser tomada del lóbulo de orejas o codos o rodillas o cejas infiltradas de la siguiente forma:

- A. Desinfectar la zona con alcohol 70°, anestesiar la lesión inyectando lidocaína al 2% en la piel intacta, subyacente a la zona que será muestreada.
- B. Con un punch nro. 4 tomar una biopsia y colocar en un tubo eppendorf con alcohol 70°.
- C. Remitir la muestra junto con la ficha epidemiológica completa al Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas – Programa Nacional de Control de la Lepra, y el laboratorio se encarga del envío al Centro de Investigación para su procesamiento.
- D. Las muestras podrían mantenerse a temperatura ambiente y enviadas al laboratorio para su procesamiento. Los bacilos son inactivados por etanol, lo que significa que las muestras pueden ser enviadas por transporte de rutina sin necesidad de controlar la temperatura durante el transporte o tomar precauciones adicionales para el control de los riesgos biológicos.

Fig 16. Toma de material para Biopsia con punzón (punch) en sacabocados



2.2.5. Interpretación de resultados

Un resultado de PCR para lepra positiva, indica presencia de bacilos de *M. leprae* en la muestra.

La técnica de amplificación de la secuencia repetitiva RLEP por PCR en tiempo real no debe ser empleada para monitoreo de tratamiento y alta médica, debido a que los pacientes que han concluido el tratamiento recomendado por la OPS/OMS poseen restos bacilares que van siendo eliminados lentamente con los años y siguen siendo detectados por el método.

2.3. VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LEPPRA

Hasta 1982, el tratamiento de la lepra se basó en la monoterapia con dapsona. La emergencia de cepas de *Mycobacterium leprae* resistentes a este antimicrobiano hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendara el uso de la poliquimioterapia (PQT), que combina tres antibióticos: dapsona, clofazimina y rifampicina. La base de la PQT es la rifampicina, ya que es el componente con mayor actividad bactericida, incluso mayor que la de nuevos antimicrobianos empleados específicamente contra *M. leprae*. La función principal de la dapsona y la clofazimina es garantizar la eliminación de las poblaciones de *M. leprae* resistentes a la rifampicina. El uso de este esquema terapéutico ha permitido reducir eficazmente la prevalencia global de la enfermedad.

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud estableció y coordinó un programa de Vigilancia Global de Resistencia a Drogas en la Lepra para monitorear la resistencia global a los fármacos contra la lepra en casos de recaída. En 2010, este programa informó de 9 casos de lepra resistente a la dapsona y 1 caso de lepra resistente a la rifampicina en 72 pacientes con lepra recidivante de 8 países participantes.

La última reunión de la Vigilancia Global de Resistencia a Drogas se llevó a cabo en Katmandú, Nepal en octubre del año 2016, donde Paraguay empezó a formar parte de dicha vigilancia. La detección de Resistencia a Drogas se lleva a cabo con la colaboración del Centro de Referencia en Lepra, Instituto Lauro de Souza Lima, Brasil.

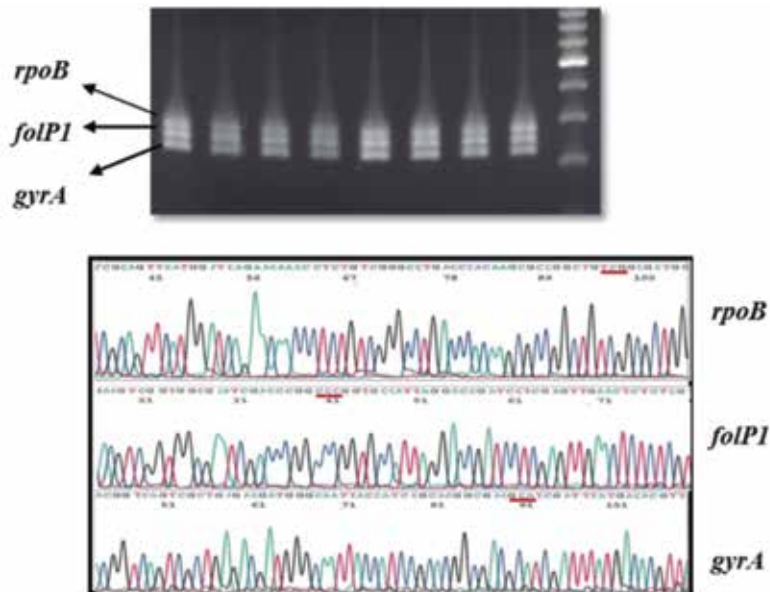
2.3.1. Objetivos

- **Laboratorio de Referencia.** Establecer una red de vigilancia utilizando un método estandarizado en todo el país para la detección de casos de resistencia primaria (casos nuevos), resistencia secundaria (recaídas) y monitorizar su tendencia.
- **Centros centinela.** Identificar y reportar los casos de recaídas para la realización de pruebas de resistencia.

2.3.2. Métodos de detección de Resistencia a Drogas

La prueba estándar para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *M. leprae* es la técnica de la almohadilla plantar del ratón, que además de costosa, demora entre 6 y 12 meses en dar resultados y está disponible en pocos laboratorios. Debido a estas limitaciones, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basadas en la detección de mutaciones puntuales en los genes *rpoB*, *folP1* y *gyrA* de *M. leprae*, las cuales se utilizan como marcadores de resistencia a la rifampicina, dapsona y ofloxacina, con una alta correlación con la prueba estándar. Esto se basa en diversas investigaciones que han demostrado que esas mutaciones puntuales en los genes *rpoB*, *folP1* y *gyrA*, son las responsables de la resistencia de *M. leprae* a la rifampicina, dapsona y ofloxacina respectivamente. Se ha podido predecir la resistencia antimicrobiana de algunos aislamientos mediante diversas técnicas de biología molecular que detectan estas mutaciones.

Fig 17. Mutaciones puntuales y resistencia en fármacos utilizados contra la lepra



```

M. leprae rpoB
Rifampin-S  ctg acc cac aag ogc cgg otg tog gog otg ggc cgg ggt
Rifampin-R  ctg acc cac aag ogc cgg otg ttg gog otg ggc cgg ggt
          *** ** * ** ** ** * * ** ** ** ** **
                               S456L

M. leprae folP1
Dapsone-S   gtc gac gtc ggt ggc gaa tog acc cgg ooc ggt gcc att
Dapsone-R   gtc gac gtc ggt ggc gaa tog acc cgg otc ggt gcc att
          *** ** * ** ** ** ** ** ** ** * 55L *** ** **

M. leprae gyrA
Ofloxacin-S  aat tac cat ccg cac ggc gac goa tog att tat gac aog
Ofloxacin-R  aat tac cat ccg cac ggc gac gta tog att tat gac aog
          *** ** * ** ** ** ** ** * 91W *** ** ** **
  
```

2.3.3. Definiciones y procedimientos

2.2.3.1. Pacientes incluidos en el estudio

- **CASOS NUEVOS:** personas que presentan signos y síntomas de lepra y que nunca han recibido tratamiento. Se estudian al 10% de casos nuevos multibacilares.
- **RECAÍDAS:** Se define como la recurrencia de la enfermedad en pacientes que terminaron el tratamiento recomendado por la OMS. Los pacientes presentan nuevamente signos y síntomas de la enfermedad. Se estudian el 100% de los pacientes con recaídas.

2.2.3.2. Materiales necesarios

- Alcohol al 70°
- Gasas estériles
- Algodón estéril
- Guantes
- Lidocaína al 2% inyectable
- Jeringas de insulina de 1 mL
- Punch o sacabocados nro. 4
- Tubos eppendorf 1,5 mL

2.2.3.3. Toma y envío de muestras

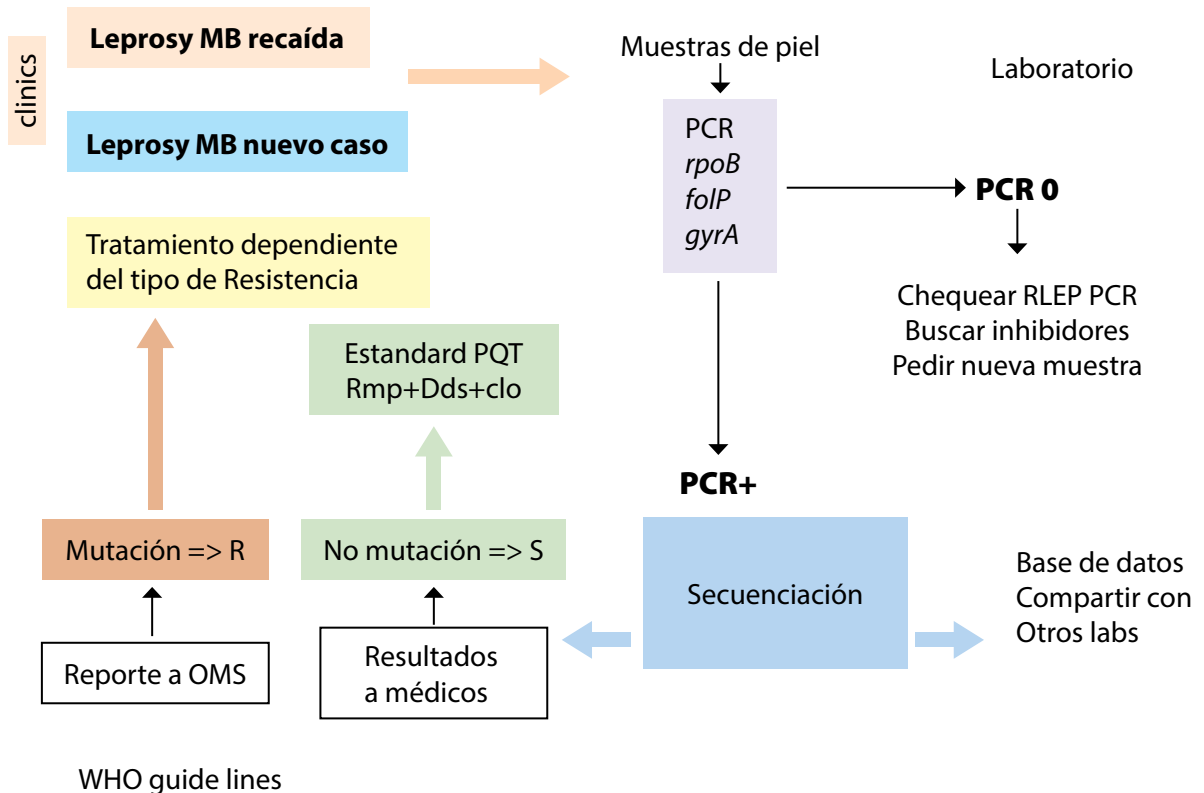
La muestra utilizada para la búsqueda de resistencia a drogas en *M. leprae* por PCR es la biopsia de piel. La misma debe ser tomada de las lesiones. En el caso de sospecha de lepra neural o difusa, la muestra debe ser tomada del lóbulo de orejas o codos o rodillas o cejas infiltradas de la siguiente forma:

- A. Desinfectar la zona con alcohol 70°, anestésiar la lesión inyectando lidocaína al 2% en la piel intacta, subyacente a la zona que será muestreada.
- B. Con un punch nro. 4 tomar una biopsia y colocar en un tubo eppendorf con alcohol 70°.
- C. Remitir la muestra junto con la ficha epidemiológica completa al Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas – Programa Nacional de Control de la Lepra, y el laboratorio se encarga del envío al Centro de Investigación para su procesamiento.
- D. Las muestras podrían mantenerse a temperatura ambiente y enviadas a laboratorios para su secuenciación posterior. Los bacilos son inactivados por etanol, lo que significa que las muestras pueden ser enviadas por transporte de rutina sin necesidad de controlar la temperatura durante el transporte o tomar precauciones adicionales para el control de los riesgos biológicos.

2.2.3.4. Reporte de resultados

Los resultados de la PCR y la secuenciación se comunicarán directamente al Programa Nacional de Control de la Lepra y al Centro / Hospital que envió la muestra (clínico a cargo del paciente) para tomar las decisiones terapéuticas.

Fig 18. OMS. Flujograma de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en Lepra



2.4. OTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

2.4.1. Pruebas serológicas

El *M. leprae* presenta una serie de sustancias que inhiben su destrucción por parte del macrófago una vez fagocitado, entre ellos el glicolípido fenólico-1 específico de superficie (PGL-1), que posee un trisacárido particular, aparentemente propio de este microorganismo. Éste induce una marcada respuesta de anticuerpos en pacientes con lepra multibacilar. Este compuesto se utiliza para las reacciones serológicas discriminatorias que se realizan por inmunoensayo enzimático (ELISA), aglutinación de látex y pruebas inmunocromatográficas. El PGL-1 ha sido implicado como mecanismo de defensa del bacilo de Hansen, a través de la inhibición de la destrucción oxidativa y la inactivación de las enzimas lisosómicas del macrófago.

Las pruebas serológicas pueden ser empleadas para el diagnóstico, monitoreo del tratamiento, y en algunos casos, la detección de exposición al bacilo de Hansen.

ANEXOS

FICHAS Y PLANILLAS

Ficha para envío de material de Baciloscopia

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRO



TESÁI HA TEKO
PORAVE
MOTENONDEHA
MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA
Y BIENESTAR SOCIAL

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE LEPRO
FORMULARIO PARA ENVIO DE MATERIAL PARA BACILOSCOPIA

REGION		DISTRITO	
SERVICIO			
FECHA TOMA		ENCARGADO	
N° TELEFONO DEL SERVICIO O ENCARGADO PARA CONTACTO			

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRES / APELLIDOS			
C.I.N°		EDAD (años)	
DOMICILIO			
TELEFONO		FORMA CLINICA	
MARQUE	Para DX		
	En Tratamiento		
	Para alta		
	Control de Calidad		

OBSERVACIONES

FIRMA



TESÁI HATEKO
PORAVE
MOTENONDEHA
MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA
Y BIENESTAR SOCIAL



DIRECCION GENERAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRO
Brasil entre Manuel Domínguez y Fulgencio R. Moreno – Tel/Fax: 021 204 633 - Asunción
CENTRO DE ESPECIALIDADES DERMATOLÓGICAS
Dr. Pellón Nº 207 casi Azara – Tel/Fax: 021 585 807 – San Lorenzo

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA DE LEPRO

Datos del paciente

Nombres y Apellidos: _____

C.I N°: _____

Fecha de Nacimiento: __-__-__ Edad: _____

Teléfono: _____ Ocupación: _____

Sexo: Femenino Masculino

Lugar de residencia: Departamento: _____

Ciudad: _____

Dirección: _____

Barrio: _____

Fecha de registro: _____ Ficha N°: _____

Datos de la enfermedad

Fecha de diagnóstico: _____ Fecha de inicio de síntomas: _____

Manifestación clínica: Lepra multibacilar

Lepra paucibacilar

Lesiones: Sí No Número de lesiones: _____

Tipo de lesiones (aclarar):

Cabeza: _____

Tronco: _____

Miembros superiores: _____

Miembros Inferiores: _____

Tratamiento previo (marcar una opción):

Multiterapia Monoterapia Sin Tratamiento

Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antimicrobiana (página 2)

Fecha de inicio de tratamiento previo: _____

Fecha de fin de tratamiento previo: _____

Tratamiento actual (marcar una opción):

Multiterapia Monoterapia Sin Tratamiento

Fecha de inicio de tratamiento actual: _____

Fecha de fin de tratamiento actual: _____

Hospitalizado: Sí No

Grado máximo de discapacidad (marcar una de las siguientes opciones):

Discapacidad grado 1 Para manos y pies: insensibilidad sin deformidad o lesión visible. Para ojos: problemas oculares, pero sin afección visual).

Discapacidad grado 2 Para manos y pies: Deformidad o lesión visible (lesión significa ulceración, acortamiento, rigidez y pérdida de la totalidad o parte de la mano o el pie). Para ojos: grave defecto visual).

DATOS CLINICOS (clasificación Ridley y Jopling)

Borderline Tuberculoide Borderline Lepromatoso
Borderline – Borderline Lepra Lepromatosa → Tipo:
Lepra Tuberculoide Lepra Indeterminada

DATOS DE LABORATORIO

Fecha de diagnóstico de laboratorio: __-__-__

Muestra

Biopsia cutánea Linfa cutánea

Prueba

Histopatología Positiva Baciloscopia Positiva
Negativa Negativa

Agente causal: *Mycobacterium leprae*

Infección /Enfermedad concurrente:

CATEGORIZACIÓN DEL CASO

Clasificación del caso (marcar una de las siguientes opciones):

Sospechoso Probable Confirmado

Reporte de resultado de Baciloscopia



TESÁI HATEKO
PORÁVE
MOTENONDEHA
MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA
Y BIENESTAR SOCIAL



DIRECCION GENERAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRO
Brasil entre Manuel Domínguez y Fulgencio R. Moreno – Tel/Fax: 021 204 633 - Asunción
CENTRO DE ESPECIALIDADES DERMATOLÓGICAS
Dr. Pellón N° 207 casi Azara – Tel/Fax: 021 585 807 – San Lorenzo

LABORATORIO

- NOMBRE:
- EDAD: C.I.: N° DE FICHA:
- FECHA:

BACILOSCOPIA

- MATERIAL: Raspado intradérmico/ Linfactánea
- Coloración de Ziehl – Neelsen:

RESULTADO

	Índice Bacilar (IB)	Índice Morfológico (IM)
Oreja Derecha		
Oreja Izquierda		
Codo Derecho		
Codo Izquierdo		
Lesión		

IB de Paciente:

Observación:

Preparación de reactivos para Baciloscopía

1. Coloración de Ziehl-Neelsen en frío

A) Solución decolorante (mezcla alcohol-ácido al 1%)

Alcohol Etílico 96° 99ml

Ácido Clorhídrico concentrado..... 1ml

- Colocar en una probeta 50 ml de alcohol etílico.
- Agregar ácido clorhídrico concentrado (1 ml) al alcohol, gota a gota,.
- Completando con alcohol etílico hasta el volumen final de 100 ml.
- Guardar en un frasco apropiado a temperatura ambiente.

B) Colorante Azul de Metileno (contratante de Ziehl-Neelsen)

Azul de Metileno 3g.

Agua destilada q.s.p 1.000ml

- Disolver el azul de metileno en agua destilada y completar hasta el volumen de 1.000 ml.
- Dejar en reposo por 24 horas, en frasco ámbar.
- Filtrar antes de usar.

C) Carbo Fucsina de Ziehl-Neelsen

Fucsina Básica 10g

Alcohol Etílico 96° 100 ml

Fenol (ácido fénico) 50 ml

Agua destilada qsp 1.000ml

- Disolver la fucsina básica en el alcohol etílico o alcohol absoluto. A continuación, colocar el fenol y homogeneizar.
- Pasar a una probeta y añadir agua destilada hasta el volumen final de 1.000 ml.
- Dejar en reposo durante 24 horas.
- Filtrar y transferir a un frasco ámbar, almacenando al abrigo de la luz.
- Agitar y filtrar antes del uso.

BIBLIOGRAFÍA

- Whitea C, Franco C. Leprosy in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* January 2015. vol. 28 no. 1 80-94. doi: 10.1128/CMR.00079-13.
- Teixeira A, Cruvinel D, Roma F, Luppino L, Resende L, Sousa T, et al. Evaluation of the agreement between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2008 [cited 2017 June 3]; 41(Suppl 2): 48-55. doi.org/10.1590/S0037-86822008000700011.
- Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. Johnson C, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2017;11(2):e0005375. doi:10.1371/journal.pntd.0005375.
- Rivero E, Barrios M, Berdasquera C, Tápanes T, Peñalver S, Ana G. La lepra, un problema de salud global. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet]. 2009 Mar [citado 2017 Jun 4]; 25(1): . Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252009000100010&lng=es.
- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Manual de Normas y Procedimientos. Programa Nacional de Control de la Lepra, Paraguay 2016.
- Brasil. Ministerio de Salud, Secretaría de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. Guía de procedimientos técnicos: baciloscopia en hanseniasis / Ministerio de Salud, Secretaría de Vigilancia en Salud, Departamento de Vigilancia. Epidemiológica. - Brasilia: Editora del Ministerio de Salud, 2010.
- Lastoria J, Morgado M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1. *An Bras Dermatol.* 2014;89(2):205-18. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>
- Lastoria J, Morgado M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2*. *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):389-403. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/abd18064841.20142460>
- Bernardes I, Goulart L. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* (2008) 300:269–290. DOI 10.1007/s00403-008-0857-y
- Hernández E, Cardona-Castro N, Rodríguez G, Villegas S, Beltrán C, Kimura M, D. Vissa V, Gómez Y. Estudio de resistencia a la rifampicina y la dapsona en tres pacientes con recurrencia de lepra. *Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health* 23(2), 2008.
- Williams D, Lewis C, Sandoval F, Robbins N, Keas S,2 Gillis T, Scollard D. Drug Resistance in Patients With Leprosy in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2014;58(1):72–3. DOI: 10.1093/cid/cit628.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013 pp 70-78
- Josep Costa. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(5):299-305.
- Soto A, Muñoz PT (2015) Leprosy Diagnosis: An Update on the Use of Molecular Tools *Lucrecia. Mol Biol* 4: 139. doi:10.4172/2168- 9547.1000139
- Arocha Francisco, Valero Nereida, Hassanhi Manzur, DeWard Jacobus, Rodríguez Zulay, Maldonado Mery et al. Anticuerpos séricos antiglicolípido fenólico 1 en personal de centros de salud en contacto con pacientes con enfermedad de Hansen. *Kasmera* [Internet]. 2006 Dic [citado 2017 nov 12]; 34(2): 102-113. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222006000200004&lng=es.

**MANUAL DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL DE LEPRO**
